

Université Bordeaux Segalen

Année 2012

THÈSE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, technologie, santé

Option : Biologie cellulaire et physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 18 Octobre 2012

Par Sherine Abdel Salam

Né(e) le 22 Février 1979 à Alexandrie

**Une action concertée du microARN miR-134 et de la protéine
LIM Kinase 1 dans la modulation de la douleur neuropathique
dans la moelle épinière du rat**

Membres du Jury

Mr. Massimiliano Beltramo - Dr. INRA - TOURS
Mr. Nagi Ali Ibrahim – Professeur - Université de Zagazig (Egypte)
Mr. Marc Landry - Professeur - Université Bordeaux 2
Mr. Ahmed Abdel Karim - Professeur - Université d’Alexandrie
Mme Marie Moftah - Associate Professeur - Université d’Alexandrie

Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse
Co- Directeur de thèse

Résumé Français

La douleur est un mécanisme physiologique très critique pour la survie. En fait, la douleur aiguë est un mécanisme d'alerte qui permet aux organismes de réagir contre les dangers imminents, en favorisant ainsi sa protection. Cependant, ses formes chroniques causent la perte de ses fonctions adaptatives et devenir aussi invalidante. Ces pathologies chroniques douloureuses représentent un coût élevé de la société et constituent un problème indispensable de la santé publique.

Les douleurs neuropathiques ayant une origine à la suite de blessures traumatiques du SNC ou du SNP sont particulièrement difficiles à traiter en utilisant les moyens thérapeutiques actuellement disponibles. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par conséquent, notre objectif est de définir les mécanismes impliqués dans ces douleurs neuropathiques.

Les lésions nerveuses sont caractérisées par une réorganisation anatomique du réseau de neurones de la corne dorsale. Des modifications neurochimiques sont également impliquées. De telles modifications pourraient conduire à l'établissement de contacts anormaux. Ces changements sont des caractéristiques communes de la plasticité neuronale qui est considérée comme une composante majeure de la douleur neuropathique. Certains des mécanismes moléculaires sous-jacents ont été soulignés ici par une variété de méthodes techniques complémentaires.

La LIMK1 est l'un des acteurs possibles de cette réorganisation épinière. Cette protéine kinase est considérablement exprimée dans les neurones. Parmi les fonctions connues et la plus caractérisées de cette protéine, est la phosphorylation d'une famille de protéines appelées « cofilines ». Ces protéines sont désactivées après la phosphorylation, ce qui induit à la réorganisation du cytosquelette d'actine.

Récemment, il a été démontré qu'un microARN (miARNs) nommé miR-134 régule l'expression de la LIMK1 en se liant au messenger de la LIMK1 (ARNm), inhibant sa traduction en protéine physiologiquement active (Schratt *et al.*, 2006).

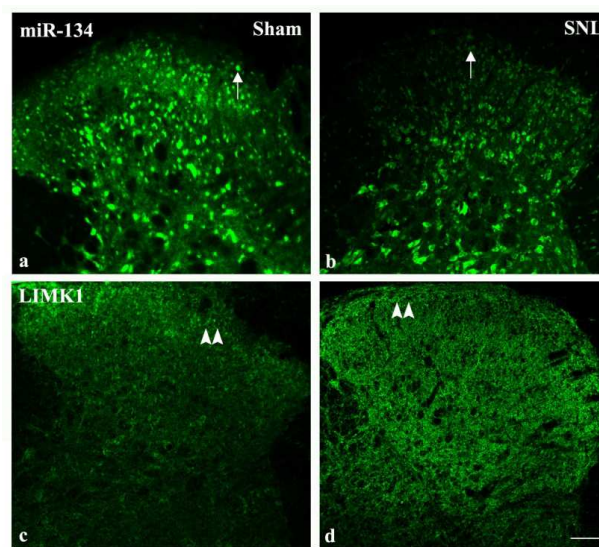
Notre hypothèse était que la régulation de la LIMK1 par miR-134 pourrait jouer un rôle essentiel dans la sensibilisation à la douleur. Cette régulation pourrait ainsi être liée non seulement à la modulation neurochimique neuronale mais aussi à la plasticité fonctionnelle associée.

Tout d'abord, à l'aide d'Immunohistochimie (IHC) et l'Hybridation *in situ* (HIS), nous avons étudié la distribution de miR-134/LIMK1 dans la corne dorsale de la moelle épinière dans des animaux Sham (groupe témoin). Dans le groupe témoin, HIS a montré que miR-134 a été exprimée tout au long de la moelle épinière. Cette expression était évidemment plus intense dans les couches superficielles de la moelle épinière plutôt que les plus profondes (Figure a). Dans la corne dorsale, miR-134 a été détecté dans les corps cellulaires et les processus dendritiques. Il a également été vu dans la corne ventrale, à la fois dans le soma et les processus. De même, l'immunomarquage a montré que la LIMK1 a été également exprimée dans les couches superficielles (Figure c).

La détection de miR-134/LIMK1 au sein des couches superficielles dans ces endroits a suggéré leur rôle éventuel dans le traitement de la douleur.

Pour confirmer ce rôle, nous avons ensuite testé les changements dans l'expression de miR-134/LIMK1 dans le modèle de douleur neuropathique (Spinal Nerve Ligation model SNL; Kim et Chung, 1992). Comme on le voit avec l'HIS, l'intensité de marquage de miR-134 a été nettement diminuée chez les rats SNL par rapport aux rats Sham (groupe témoin) (Figure a et b). Au contraire, l'IHC a montré une certaine augmentation de l'expression LIMK1 chez les rats neuropathiques comparant à ceux témoins (Figure c et d).

La sous-expression de miR-134 était concomitante à l'augmentation de la LIMK1 illustrée par l'IHC. Au moyen de qRT-PCR, nous avons quantifié et confirmé ce résultat. MiR-134 était significativement sous-exprimé chez les rats SNL (miR-134 = expression $42,66\% \pm 19,36$ dans les rats SNL vs $101,72\% \pm 9,84$ dans les rats Sham, $p < 0,05$). Le résultat inverse était prouvé pour LIMK1 qui a été surexprimée chez les rats neuropathiques ($189,48\% \pm 35,97$ pour les SNL vs $106,54\% \pm 13,55$ pour les Sham, $p < 0,05$).



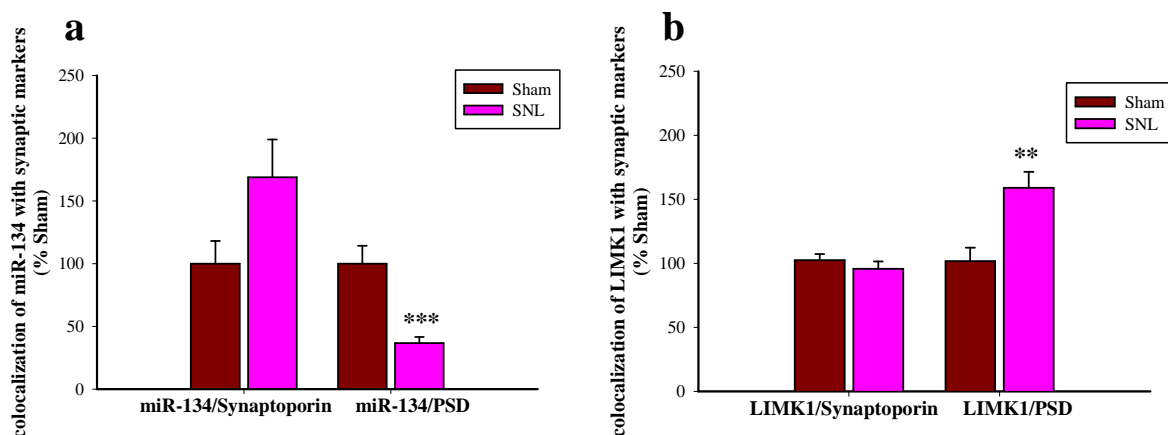
Il est important de noter ici que l'ISH est une méthode de détection connue récemment et qui a été identifiée pour visualiser les miARNs. Dans le cadre de cette thèse, nous avons présenté des différents protocoles d'HIS pour détecter l'ARNm et les miARNs au niveau de la microscopie optique et électronique en utilisant une diversité de types de sonde: oligo-ou ribosondes et les LNA (Locked Nucleic Acid). Nous avons montré également une combinaison de HIS avec d'autres techniques histochimiques (comme IHC) permettant le co-marquage de ces molécules avec des différents marqueurs synapiques.

Les différents protocoles de l'HIS ont été également discutés dans cette partie.

Nous avons proposé des protocoles détaillés utilisés pour:

- 1 - La détection chromogénique de oligosondes.
- 2 - La détection chromogénique de ribosondes avec la TSA (Tyramide Signal Amplification).
- 3 - La double détection chromogénique de ribosondes.
- 4 - La détection par fluorescence des sondes LNA avec TSA.
- 5 - Le double marquage fluorescent combinant IHC et HIS avec sondes LNA.
- 6 - L'HIS au niveau du microscope électronique avec des particules d'or renforcées avec l'argent.

Ensuite, pour définir la localisation synaptique de ces deux molécules, un co-immunomarquage de miR-134 et LIMK1 avec les marqueurs synaptiques ; la Synaptoporine et la PSD-95 a été atteint. Comme montré ci-dessous (Figure a et b), une localisation postsynaptique de miR-134 a été trouvée dans la corne dorsale de la moelle épinière des rats Sham, cette colocalisation avec la PSD-95 a diminué d'une manière significative dans les rats SNL, en face d'une augmentation avec la LIMK1. Tandis que cette colocalization est restée insignificative avec la Synaptoporine dans les deux cas (miR-134 et LIMK1).

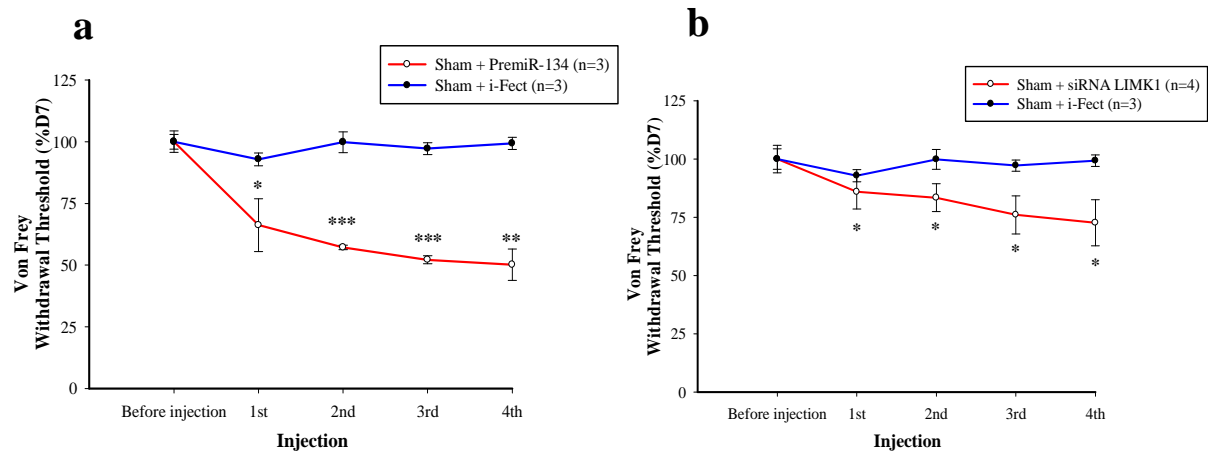


L'HIS en microscopie électronique a révélé aussi que miR-134 montre une distribution répandue non seulement dans le cytoplasme, mais aussi dans le noyau. Celui-ci peut être correspondant au miARNs pré-mature qui sont exportés vers le cytoplasme. En outre, miR-134 était vu dans le voisinage d'une synapse excitatrice asymétrique suggérant un ciblage post-synaptique. MiR-134 était également trouvé dans les processus neuronaux comme en témoigne dans une dendrite en coupe transversale. MiR-134 apparaissait souvent enchâssé dans des compartiments sous-cellulaires, les P-bodies. La détection du marquage de miR-134 en microscopie électronique, dans le voisinage des contacts synaptiques, indique que miR-134/LIMK1 est susceptible de jouer un rôle dans la dynamique de l'actine autour des zones actives.

Par la suite, afin de vérifier les changements comportementaux douloureux induits par miR-134 et la LIMK1 et leur rôle fonctionnel dans la douleur, nous avons essayé de contrer les variations endogènes observées de miR-134 et LIMK1.

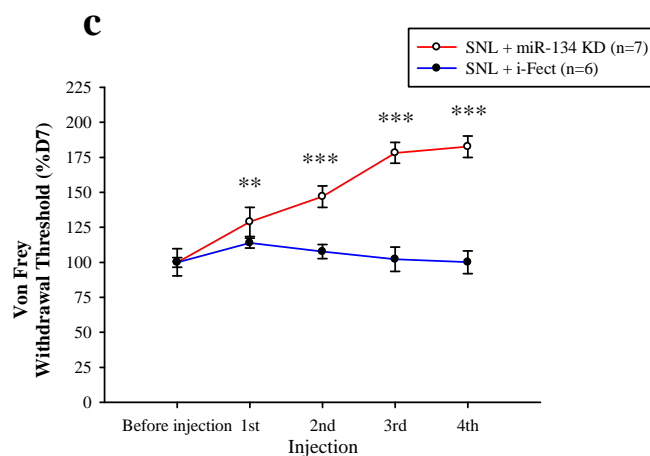
Nous avons effectués des injections intrathécales de siRNA anti-LIMK1 pour inhiber l'expression endogène de la LIMK1 chez les rats SNL. C'était intéressant de ne pas avoir trouvé aucun changement comportemental chez les rats SNL après ce type d'injection. Une surexpression artificielle de miR-134 en utilisant un précurseur de miR-134 (premiR-134) chez les rats SNL a montré le même effet.

Ensuite, nous avons essayé d'effectuer les mêmes injections chez les rats Sham, et c'était plus intéressant de trouver que ces injections (premiR-134 et siRNA LIMK1) ont provoqué une hypersensibilité douloureuse chez les rats Sham (Figure a et b respectivement). Cela a été illustré au moyen de deux tests de comportement; le Von Frey et la distribution pondérale dynamique.



Au total, ces résultats indiquent que l'augmentation de l'expression de miR-134-, et la diminution concomitante de la LIMK1, ne peut pas normaliser le seuil de la douleur, mais plutôt provoquer des douleurs dans des conditions normales.

Pour étudier l'effet inverse, nous avons inhibé miR-134 en utilisant une sonde spécifique KD (Knock-Down); une diminution significative inattendue dans le seuil de retrait a été observée avec le test de Von Frey (Figure c), et a été confirmée par le test de la distribution pondérale dynamique (Dynamic Weight Bearing). qRT-PCR dans la plupart de ces cas a confirmé la corrélation *in vivo* entre miR-134 et la LIMK1.



Enfin, nous avons cherché un mécanisme d'action possible qui pourrait réguler cette modulation. Des données récentes publiées ont montré une implication de l'ADF (Actin Depolymerization factor) / cofiline sur le trafic des récepteurs AMPA (AMPA). Les AMPAR sont fondamentalement impliqués dans le traitement de terminaisons synaptiques nociceptives. Au niveau de la synapse, la voie miR-134-dépendante de la LIMK1/Cofiline régule la plasticité synaptique. La suppression de la Cofiline réduit la mobilité des AMPAR et diminue la LTP. Enfin, l'activation des AMPAR est le premier déclencheur de la transmission nociceptive dans la corne dorsale de la moelle épinière. En outre, les AMPAR agissent en tant que déterminants de l'hyperalgésie spinale puisque la composition et les propriétés du récepteur sont réglementées de manière dynamique dans les états douleur.

Nous avons donc étudié les mécanismes d'action possibles de miR-134/LIMK1 dans les cellules spinales. Puisque AMPAR est une composante principale de la nociception spinale, nous avons donc testé leur effet sur l'insertion des AMPAR dans un modèle de culture de cellules neuronales.

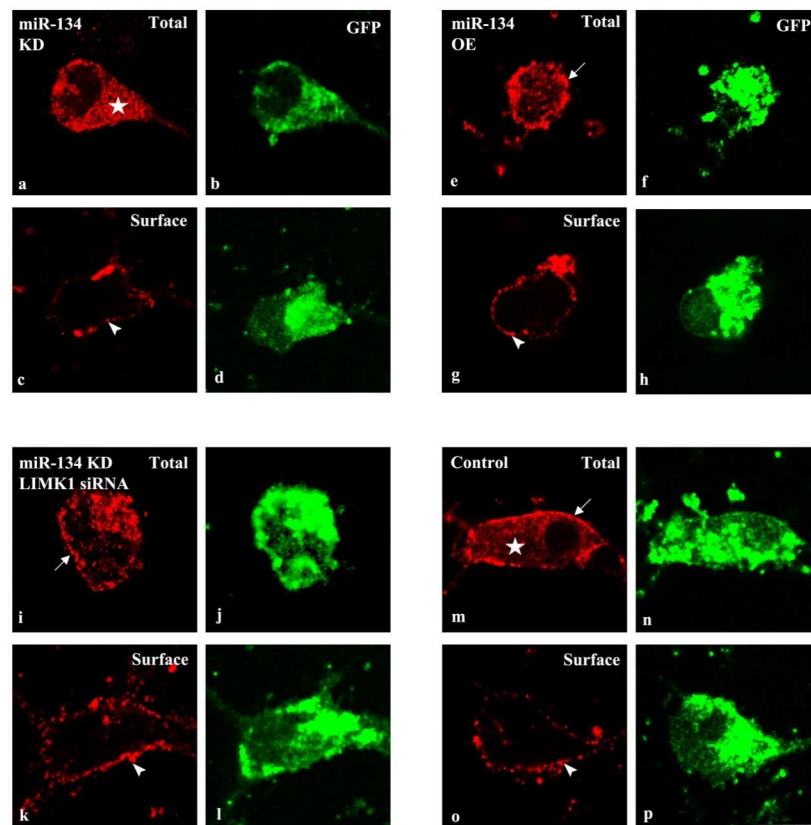
Pour étudier ce mécanisme, nous avons appliqué les mêmes sondes utilisées *in vivo* afin de manipuler l'expression miR-134 et LIMK1 sur un modèle de culture neuronale.

GluA1 et GluA2 sont les sous-unités principaux de AMPAR, nous avons donc mesuré l'immunomarquage total (après une perméabilisation cellulaire) et membranaire (après une incubation avec l'anticorps primaire sur les cellules vivantes) pour les deux sous-unités. Le ratio entre le marquage total et membranaire a été utilisé comme un indice quantitatif de trafic des récepteurs. Le vecteur contenant GFP a été co-transfecté pour identifier les neurones transfectés.

En accord avec les résultats mentionnés ci-dessus, la transfection du KD de miR-134 a montré une diminution dans les AMPAR adressés à la membrane plasmique. Par contre, la transfection de siRNA-LIMK1 a montré un effet inverse.

Comme indiqué ci-dessous, la sous-expression de miR-134 entrave d'une manière significative l'insertion des AMPAR à la membrane plasmique. La transfection de miR-134 KD a diminué significativement le marquage de surface pour GluA1 (Figure c et d). Au contraire, la surexpression de miR-134 à l'aide de la transfection de pré-miR-134 (miR-134 OE) a augmenté l'immunomarquage de la surface (Figure g et h).

Dans les conditions où le marquage de surface a été diminué (la transfection de miR-134 KD ou la surexpression de la LIMK1), la perméabilisation cellulaire (marquage total) a entraîné un marquage intense dans le cytoplasme, ce qui suggère une accumulation des AMPAR dans la voie sécrétoire (Figure a et e).



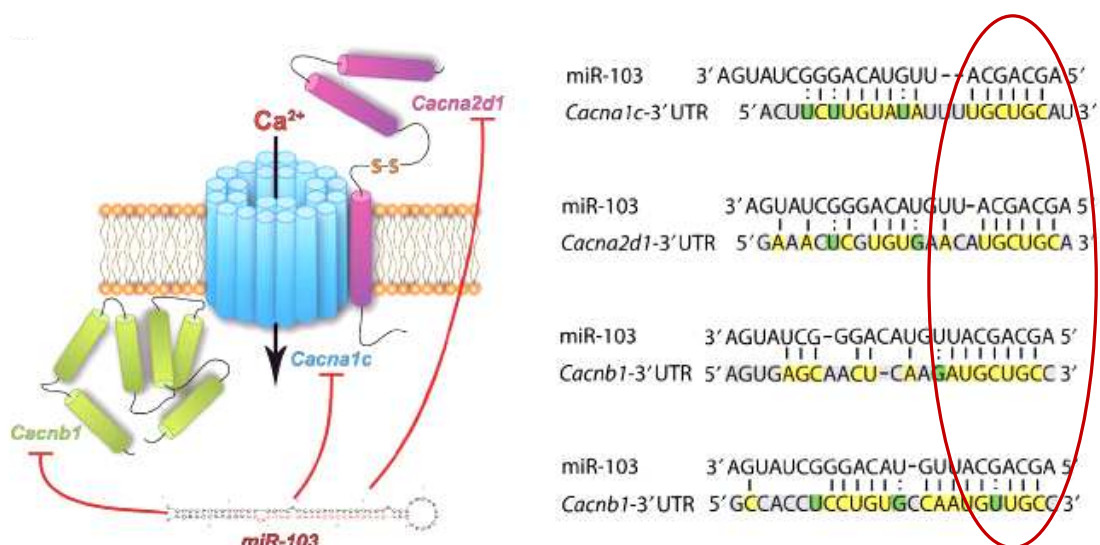
Pour confirmer que l'effet de miR-134 sur le trafic des AMPAR est en fait médié par la répression de l'expression de la LIMK1, nous avons effectué la transfection

de deux miR-134 KD et anti-LIMK1 siRNA avec la GFP. Dans cette condition, la diminution de marquage de surface induite par miR-134KD a été abolie (Figure k), et l'immunomarquage était semblable à celui de contrôle (Figure o).

Ces résultats suggèrent que l'effet antinociceptif de KD de miR-134 et la surexpression de la LIMK1 est indirectement régulé par l'insertion des AMPAR à la membrane plasmique.

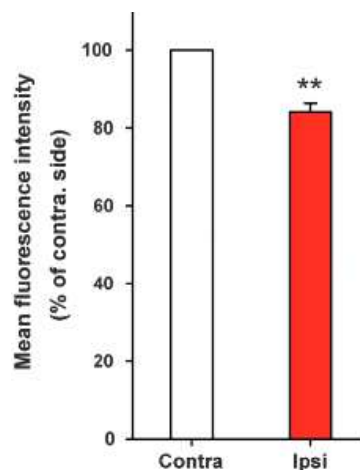
Dans leur ensemble, nos données fournissent des informations nouvelles dans le rôle des miARNs dans la sensibilisation à la douleur, ce qui démontre un mécanisme dépendant de miARN endogène pour antinociception.

Il semble que miR-134 exerce un effet différent sur la douleur neuropathique que miR-103 un autre miARN discuté aussi dans le cadre de cette thèse. MiR-103 a été démontré comme un régulateur de plusieurs cibles (panneau de droite), les trois sous-unités formant les canaux calciques de type-L « Cav1.2 LTC » (panneau de gauche). Il a été démontré que la sensibilisation à la douleur inclut une activation de Cav1.2 qui modifie en conséquence l'expression des gènes au pendant cette forme de plasticité.



Puisque l'inhibition spécifique de Cav1.2-LTC dans la corne dorsale spinale renverse la neuropathie associée à l'hypersensibilité mécanique et l'hyperexcitabilité menant à une augmentation dans la réponse des neurones de la corne dorsale (Fossat et al., 2010), nous avons donc essayé d'étudier le rôle possible de miR-103 dans la sensibilisation des neurones *in vivo*. Nous avons trouvé une hypersensibilité modérée mais significative de la douleur chez les animaux naïfs après quatre injections intrathécales quotidiennes de miR-103-KD par rapport aux animaux injectés avec un scramble de miARN. Cela suggère un contrôle antinociceptif par miR-103 endogène.

En outre, pour élucider le rôle de la régulation de Cav1.2-LTC par miR-103 dans les mécanismes de la douleur, nous avons étudié l'expression de miR-103 dans la corne dorsale de la moelle chez les rats SNL. L'intensité du marquage de miR-103 par HIS MiR-103 a été nettement diminuée dans le côté ipsilatéral à la lésion par rapport au côté controlatéral comme montré dans le figure ci-dessous.



A l'inverse de miR-134, la surexpression de miR-103 soulage la douleur neuropathique. Elle diminue le seuil de retrait dans le test de Von Frey.

Contrairement au miR-134, miR-103 exerce un rôle pronociceptive pendant la douleur neuropathique (Figure B).

